

## Sosis daging





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi .....	2
5 Klasifikasi.....	2
6 Syarat mutu .....	2
7 Pengambilan contoh .....	4
8 Cara uji .....	4
9 Syarat lulus uji .....	5
10 Higiene.....	5
11 Pengemasan.....	5
12 Syarat penandaan .....	5
Lampiran A .....	6
Bibliografi .....	39
Tabel 1 – Syarat mutu sosis daging .....	3
Tabel 2 – Persyaratan cemaran mikroba sosis daging.....	3



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Sosis daging* ini merupakan revisi SNI 01 – 3820 – 1995, *Sosis daging*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
2. Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
3. Melindungi kesehatan konsumen;
4. Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
5. Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri pengolahan daging.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian.
5. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2014 tentang Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
7. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
8. Peraturan Menteri Pertanian No. 20/Permentan/OT.140/4/2009 tentang tentang Pemasukan dan Pengawasan Peredaran Karkas, Daging, dan/atau Jeroan dari luar negeri.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang Pada Kemasan Pangan Dari Plastik.
10. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
11. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033/MENKES/PER/VII/2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.
12. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
13. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh **Komite Teknis 67-04, Makanan dan Minuman** Kementerian Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 4 Desember 2012 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Mei 2013 sampai dengan tanggal 23 Juli 2013 dan pemungutan suara pada tanggal 23 Maret 2015 sampai dengan tanggal 22 Mei 2015 dengan hasil akhir RASNI.



## Sosis daging

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, klasifikasi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji sosis daging.

Standar ini hanya berlaku untuk sosis yang dibuat dengan bahan baku daging sapi, kerbau, kambing, domba, babi, hewan ternak lainnya yang layak dimakan, dan atau hewan unggas.

### 2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 6887-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1 : aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran decimal*.

SNI ISO 6887-2:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 2 : aturan khusus untuk penyiapan daging dan produk daging*

SNI ISO 6888-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metoda horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulasi-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 1:Teknik menggunakan media Baird Parker Agar*.

SNI ISO 7251:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Escherichia coli terduga – Teknik angka paling mungkin (APM)*

SNI ISO 7937:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi Clostridium pefringens – Teknik penghitungan koloni*

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **sosis daging**

produk berbahan baku daging yang dihaluskan dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan dan dimasukkan ke dalam selongsong sosis dengan atau tanpa proses pemasakan

#### 3.2

##### **daging untuk sosis**

daging sapi, kerbau, kambing, domba, babi, unggas atau hewan ternak lainnya, dan/atau campurannya, *Mechanically Deboned Meat* (MDM), *Desinewed Minced Meat* (DMM), jantung, hati dan kulit hewani

#### 3.3

##### **proses pemasakan**

proses pemasakan sosis daging dapat melalui sterilisasi atau non sterilisasi



### 3.4

#### **selongsong sosis**

dapat terbuat dari bahan alami dan/atau bahan sintetis tara pangan yang dapat dimakan atau tidak dapat dimakan

### 3.5

#### ***mechanically deboned meat (MDM)***

jenis daging tanpa tulang yang diperoleh dengan cara memisahkan daging hewan ternak dan unggas yang tersisa dari tulang setelah pemrosesan daging tanpa tulang (*deboning*) melalui metode pemisahan secara mekanik

### 3.6

#### ***desinewed minced meat (DMM)***

jenis daging tanpa tulang yang diperoleh dengan cara memisahkan daging daging hewan ternak dan unggas yang tersisa dari tulang setelah pemrosesan daging tanpa tulang (*deboning*) melalui metode pemisahan secara mekanis, menghasilkan produk yang lebih kasar dari MDM

## 4 Komposisi

### 4.1 Bahan baku

Daging sapi, kerbau, kambing, domba, babi, unggas atau hewan ternak lainnya, dan atau campurannya.

### 4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk sosis daging sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

### 4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk sosis daging sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

## 5 Klasifikasi

Sosis daging diklasifikasikan sebagai berikut :

- a) Sosis daging;  
sosis daging merupakan sosis dengan kandungan daging minimal 35%.
- b) sosis daging kombinasi;  
sosis daging kombinasi merupakan sosis dengan kandungan daging minimal 20%.

## 6 Syarat mutu

Syarat mutu sosis daging sesuai Tabel 1 di bawah ini.



Tabel 1 – Syarat mutu sosis daging

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan	
			Sosis daging	Sosis daging kombinasi
1	Keadaan			
1.1	Bau	-	normal	normal
1.2	Rasa	-	normal	normal
1.3	Warna	-	normal	normal
2	Air*	% (b/b)	maks. 67	maks. 67
3	Abu	% (b/b)	maks. 3,0	maks. 3,0
4	Protein (N x 6,25)	% (b/b)	min. 13	min. 8
5	Lemak	% (b/b)	maks. 20	maks. 20
6	Cemaran logam			
6.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0	
6.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,3	
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0 / maks. 200,0 **	
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03	
7	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5	
8	Cemaran mikroba		sesuai Tabel 2	
<b>CATATAN:</b> * kecuali kadar air sosis daging yang dikemas dalam kemasan bermedia ** sosis daging yang dikemas dalam kaleng				

Tabel 2 – Persyaratan cemaran mikroba sosis daging

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan		
			Sosis daging dan Sosis daging kombinasi	Sosis daging dan sosis daging kombinasi siap makan	
				Kemasan tidak bermedia	Kemasan bermedia*
1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. $1 \times 10^5$	maks. $1 \times 10^4$	maks. $1 \times 10^2$
2	<i>Coliform</i>	APM/g	maks. 10	< 3	-
3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3	-	-



Tabel 2 - (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan		
			Sosis daging dan Sosis daging kombinasi	Sosis daging dan sosis daging kombinasi siap makan	
				Kemasan tidak bermedia	Kemasan bermedia*
4	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif / 25 g	negatif / 25 g	-
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$	maks. $1 \times 10^2$	-
6	<i>Clostridium perfringens</i>	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$	maks. 10	negatif
7	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	negatif / 25 g	-
<b>CATATAN:</b> *kemasan bermedia antara lain kaleng, gelas jar, pouch.					

## 7 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

## 8 Cara uji

Cara uji untuk sosis daging seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1;
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2;
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
  - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3;
- d) Cara uji kadar abu sesuai Lampiran A.4;
- e) Cara uji kadar protein sesuai Lampiran A.5;
- f) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.6;
- g) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7;
  - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.7.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3
- h) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8;
- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9;
  - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.9.1, SNI ISO 6887-1 dan SNI ISO 6887-2
  - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.2
  - Cara uji *Coliform* sesuai Lampiran A.9.3
  - Cara uji *Escherichia coli* sesuai SNI ISO 7251
  - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.9.4
  - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai SNI ISO 6888-1
  - Cara uji *Clostridium perfringens* sesuai SNI ISO 7937
  - Cara uji *Listeria monocytogenes* sesuai Lampiran A.9.5



## 9 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu pada Pasal 6.

## 10 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## 11 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 12 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.





**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji sosis daging**

**A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan contoh sosis daging dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik**

Buka kemasan contoh sosis daging dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia**

Buka kemasan contoh sosis daging dan ambil contoh sebanyak 200 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.2 Keadaan**

**A.2.1 Bau**

**A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".



## A.2.2 Rasa

### A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

### A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh secukupnya, goreng hingga matang, rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

## A.2.3 Warna

### A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh dengan indera penglihat (mata) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

### A.2.3.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- lihat warna contoh uji;
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

## A.3 Kadar air

### A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu  $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

### A.3.2 Peralatan

- Oven terkalibrasi;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator yang berisi desikan; dan
- Pinggan aluminium tertutup dengan diameter 50 mm dan tinggi/kedalaman kurang dari atau sama dengan 40 mm.



### A.3.3 Cara kerja

- Panaskan pinggan aluminium beserta tutupnya dalam oven pada suhu  $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 1 jam, kemudian dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik ( $W_0$ );
- masukkan 2 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang ( $W_1$ );
- panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu  $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 2 sampai dengan 4 jam setelah suhu oven  $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit, sehingga suhunya sama dengan suhu ruang, kemudian timbang hingga diperoleh bobot konstan ( $W_2$ );
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar air dalam contoh.

### A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left( \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

#### Keterangan:

$W_0$  adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

### A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.4 Abu

### A.4.1 Prinsip

Kadar abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu  $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$  sampai terbentuk abu berwarna putih.

### A.4.2 Peralatan

- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1 ^\circ\text{C}$ ;
- Pemanas listrik;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator yang berisi desikan; dan
- Cawan porselen/kuarsa volume 30 mL hingga 50 mL.

### A.4.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada suhu  $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$  selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang dengan neraca analitik ( $W_0$ );
- masukkan 3 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam cawan dan timbang ( $W_1$ );



- c) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut pada pemanas listrik hingga menjadi arang, kemudian tempatkan dalam tanur pada suhu  $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$  sampai terbentuk abu berwarna putih dan diperoleh bobot tetap;
- d) pindahkan segera ke dalam desikator sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang ( $W_2$ );
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung abu dalam contoh.

#### A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu (\%)} = \left( \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

#### Keterangan:

$W_0$  adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot cawan dan contoh sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot cawan dan contoh setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil perhitungan abu. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.5 Kadar protein ( $N \times 6,25$ )

#### A.5.1 Prinsip

Contoh didestruksi untuk melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi  $\text{NH}_3$  pada saat destilasi menggunakan  $\text{NaOH}$ .  $\text{NH}_3$  yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

#### A.5.2 Peralatan

- a) Alat destilasi Kjeldahl konvensional atau otomatis;
- b) Alat destruksi;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik; dan
- e) Buret 10 mL terkalibrasi.

#### A.5.3 Pereaksi

- a) Katalis tablet mengandung 3,5 g Kalium Sulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) dan 0,175 g Merkuri Oksida ( $\text{HgO}$ ), atau campuran Selen;
- b) Larutan indikator *methyl red* (MR)/ *bromocresol green* (BCG);  
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95% menjadi 100 mL. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95% menjadi 500 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- c) Larutan asam borat ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 4%;  
timbang 4 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , larutkan ke dalam air yang mengandung 0,7 mL larutan indikator *methyl red* 1% *bromocresol green* 1%, encerkan hingga 100 mL, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.



- d) Larutan natrium hidroksida - natrium thiosulfat ( $\text{NaOH} - \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ;  
larutkan 2 000 g hablur  $\text{NaOH}$  dan 125 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  dengan air suling menjadi 5 000 mL,  
simpan ke dalam botol bertutup karet.
- e) Larutan standar asam klorida,  $\text{HCl}$  0,2 M;
- f) Larutan hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% sampai dengan 35%;
- g) Larutan asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- h) Batu didih.

#### A.5.4 Cara kerja

- a) Timbang secara teliti 1 g sampai dengan 2 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*,  
tambahkan 2 katalis tablet atau 1 g campuran katalis selen, 8 sampai dengan 10 batu  
didih dan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih  
kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit  
pengisapan asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) suling selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai  
kira-kira 150 mL, dengan penampung destilat adalah 50 mL larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4%;
- e) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- f) titar larutan campuran destilat dengan larutan  $\text{HCl}$  0,2 M; dan
- g) kerjakan penetapan blanko.

#### A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100\%}{W}$$

##### Keterangan:

- $V_1$  adalah volume  $\text{HCl}$  0,2 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- $V_2$  adalah volume  $\text{HCl}$  0,2 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- N adalah normalitas larutan  $\text{HCl}$ , dinyatakan dalam Normalitas (N);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
- 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
- 6,25 adalah faktor protein untuk daging.

#### A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.6 Kadar lemak

#### A.6.1 Prinsip

Hidrolisis lemak dalam contoh menggunakan  $\text{HCl}$  kemudian diekstraksi dengan petroleum eter. Ekstrak petroleum eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

#### A.6.2 Peralatan

- a) Alat *Soxhlet* lengkap;
- b) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;



- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Penangas air;
- e) *Thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran 33 mm x 80 mm;
- f) Desikator yang berisi desikan;
- g) Labu lemak 250 mL;
- h) Gelas piala 500 mL atau 300 mL;
- i) Kaca arloji; dan
- j) Kertas saring bebas lemak.

### A.6.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida (HCl) 8 M;
- b) Petroleum eter atau heksan;
- c) Larutan perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) 0,1 M;  
larutkan  $(17,0 \pm 0,1)$  g ( $\text{AgNO}_3$ ) p.a. di dalam 1 000 mL air suling.
- d) Air suling; dan
- e) Batu didih.

### A.6.4 Cara kerja

#### A.6.4.1 Hidrolisis

- a) Timbang 4 g sampai dengan 5 g contoh (m) yang telah dipersiapkan dengan teliti ke dalam gelas piala 300 mL atau 500 mL;
- b) tambahkan 45 mL air suling mendidih dengan perlahan sambil diaduk hingga homogen;
- c) tambahkan 55 mL HCl 8 M (30 mL HCl ditambah 20 mL air) dan beberapa butir batu didih);
- d) tutup gelas piala tersebut dengan kaca arloji lalu didihkan perlahan-lahan selama 15 menit;
- e) bilas kaca arloji dengan air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- f) saring endapan menggunakan kertas saring bebas lemak;
- g) bilas gelas piala 3 kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas klor yang dapat ditentukan dengan penambahan 1 tetes sampai dengan 3 tetes  $\text{AgNO}_3$  0,1 M pada filtrat, jika tidak terdapat endapan putih ( $\text{AgCl}$ ) maka telah bebas klor; dan
- h) pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring bebas lemak dan keringkan 6 jam pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C.

#### A.6.4.2 Ekstraksi

- a) Keringkan labu lemak yang berisi beberapa butir batu didih selama 1 jam;
- b) dinginkan dalam desikator dan timbang ( $W_0$ ), sambungkan dengan alat ekstraksi *Soxhlet*;
- c) masukkan *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam *Soxhlet* (sebaiknya *thimble* ditopang *glass bead*), bilas piala yang digunakan untuk hidrolisis dan yang digunakan waktu pengeringan dengan petroleum eter atau heksan sebanyak 3 x 5 mL, tuangkan ke dalam *Soxhlet*, kemudian tuangkan petroleum eter sebanyak 2/3 kapasitas labu di atas penangas;
- d) ekstrak selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi lebih dari 30 kali;
- e) keringkan labu lemak beserta lemak di dalam oven pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C selama 1,5 jam sampai dengan 2 jam;
- f) dinginkan dalam desikator dan timbang ( $W_1$ ); dan
- g) ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan bobot lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05 %.



### A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100\%$$

**Keterangan:**

- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 W<sub>0</sub> adalah bobot labu lemak kosong, dinyatakan dalam gram (g);  
 W<sub>1</sub> adalah bobot labu lemak kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

### A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

## A.7 Cemaran logam

### A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

#### A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

#### A.7.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 20 µm sampai dengan 25 µm.

#### A.7.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO<sub>3</sub> pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO<sub>3</sub> 0,1 N;  
encerkan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;  
encerkan 500 mL HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;



- larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- f) Larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
  - g) Larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
  - h) Larutan baku kerja Cd;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,8  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,4  $\mu\text{g/mL}$  dan 1,8  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
  - i) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
  - j) Larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  Pb; dan  
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/mL}$ .
  - k) Larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 2,0  $\mu\text{g/mL}$  Pb.

#### A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur ( $450 \pm 5$ )  $^{\circ}\text{C}$  sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes  $\text{HNO}_3$  pekat kira-kira 0,5 sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu ( $450 \pm 5$ )  $^{\circ}\text{C}$  kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sebanyak 10 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tetapkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;



- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

#### A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran *relative standard deviation* (RSD) dari dua kali ulangan maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

### A.7.2 Timah (Sn)

#### A.7.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

#### A.7.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur 50 mL; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

#### A.7.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida ( $\text{KCl}$ ) 10 mg/mL;  
larutkan 1,91 g  $\text{KCl}$  dengan air suling menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) pekat;
- c) Asam klorida ( $\text{HCl}$ ) pekat;
- d) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn; dan  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.



- e) Larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

#### A.7.2.4 Cara kerja

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, keringkan dalam oven 120 °C, tambahkan 30 mL HNO<sub>3</sub> pekat dan biarkan 15 menit (jangan tambahkan HNO<sub>3</sub> ke dalam contoh jika tahapan destruksi tidak dapat diselesaikan dalam hari yang sama);
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl<sub>2</sub> berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL aquabides (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh;

#### A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)  
V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan  
W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.7.3 Merkuri (Hg)

#### A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg



yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

#### A.7.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

#### A.7.3.3 Pereaksi

- Larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 9 M;
- Larutan asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) 7 M;
- Campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$ ) 1:1;
- Hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pekat;
- Larutan natrium molibdat ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 2%;
- Larutan pereduksi;  
campurkan 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ );  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian tambahkan 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg; dan  
pipet 1 mL larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- Larutan baku kerja Hg; dan  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg.
- Batu didih.



### A.7.3.4 Cara kerja

#### A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$ ) 1:1 melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

#### A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.



### A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

**Keterangan:**

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

### A.7.3.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.8 Cemarkan arsen (As)

### A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

### A.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas piala 200 mL.

### A.8.3 Pereaksi

- Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- Asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- Ammonium oksalat,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- Larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$  4 %;



- larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- g) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
larutkan 66 mL  $\text{HCl}$  pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
  - h) Larutan timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL  $\text{HCl}$  pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
  - i) Larutan kalium iodida,  $\text{KI}$  20%;  
timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
  - j) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL;  
larutkan 3,75 g  $\text{MgO}$  dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
  - k) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  As;  
larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20% dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
  - l) Larutan baku 100  $\mu\text{g/mL}$  As;  
pipet 10 mL larutan baku As 1 000  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  As.
  - m) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As; dan  
pipet 1 mL larutan baku As 100  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  As.
  - n) Larutan baku kerja As.  
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  As.

#### A.8.4 Cara kerja

##### A.8.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) Tambahkan 2 mL  $\text{HClO}_4$  70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan  $\text{HClO}_4$ , tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- d) Dinginkan, tambahkan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 mL  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) Panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- f) Dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) Pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 mL  $\text{KI}$  20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;



- j) Baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- l) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) Lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) Hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 0,5 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 7 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu  $450^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 mL  $\text{KI}$  20 % ,biarkan minimal 2 menit dan tepatkan sampai tanda tera pada labu takar 50 mL. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,05  $\mu\text{g/mL}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter ( $\mu\text{g/mL}$ );
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

#### A.8.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.



## A.9 Cemarkan mikroba

### A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total, dan *Coliform*

#### A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### A.9.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

#### A.9.1.3 Larutan pengencer untuk angka lempeng total

*Buffered peptone water (BPW)*

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Disodium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### A.9.1.4 Larutan pengencer untuk *coliform*

*Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);*

- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34 g
- Air suling	500 mL

Larutkan bahan-bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL, kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.



**A.9.1.5 Homogenisasi contoh untuk angka lempeng total**

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

**A.9.1.6 Homogenisasi contoh untuk *coliform***

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

**A.9.2 Angka lempeng total****A.9.2.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

**A.9.2.2 Peralatan**

- a) Inkubator  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- g) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

**A.9.2.3 Pembenihan dan pengencer**

- a) Buffered peptone water (BPW)

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Disodium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu  $121 ^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

- b) *Plate count agar* (PCA)

- Yeast extract	2,5 g
- Pancreatic digest of caseine	5 g
- Glukosa	1 g
- Agar	15 sampai dengan 20 g
- Air suling	1 L

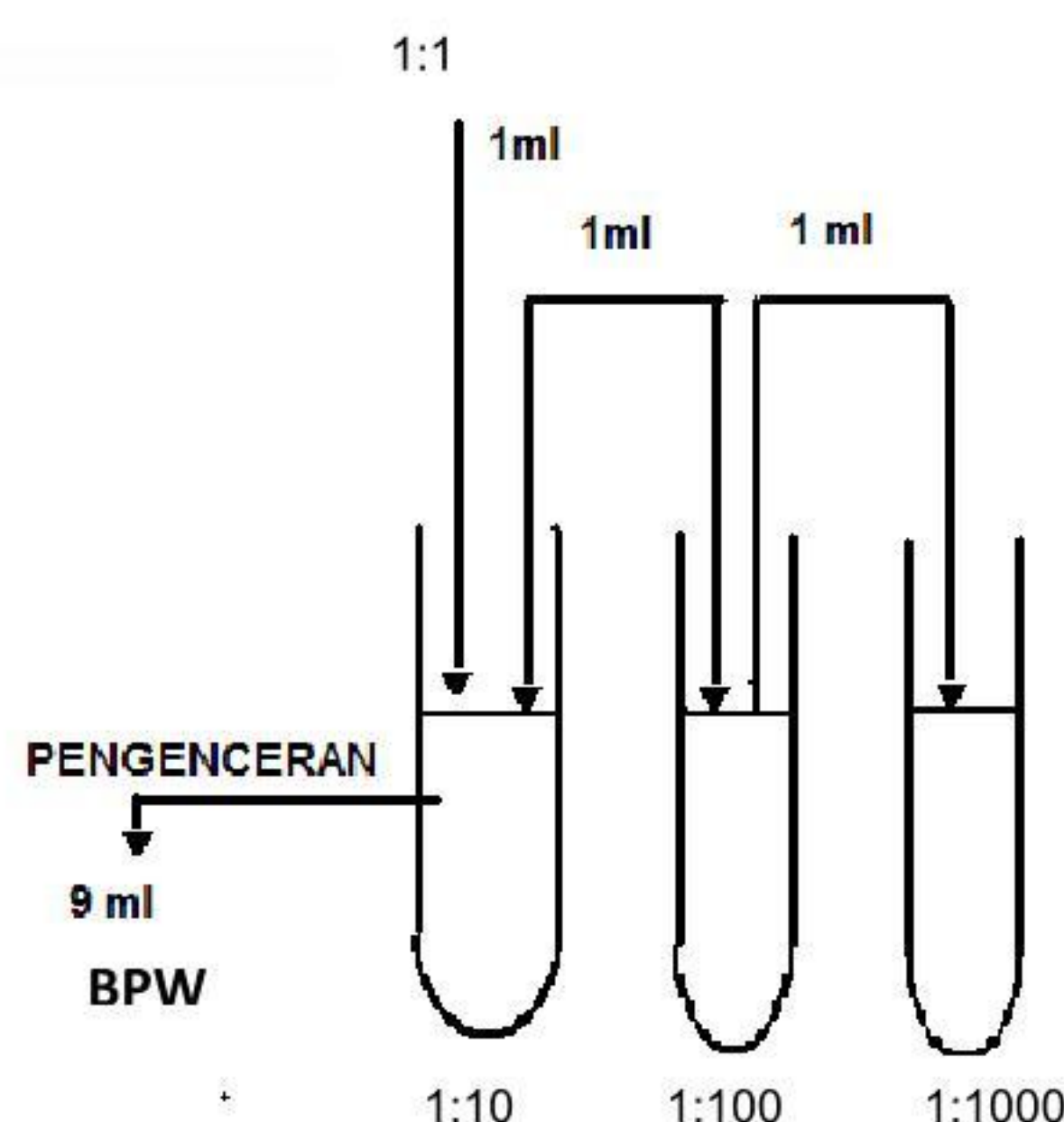
Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada  $121 ^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

**A.9.2.4 Cara kerja**

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan



pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.



**Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffer Peptone Water* (BPW)**

- Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran  $10^1$ -  $10^4$  ke dalam cawan Petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
- Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram dan inkubasikan pada suhu  $30 ^\circ\text{C}$  selama 72 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

#### A.9.2.5 Perhitungan

$$\text{Angka lempeng total (koloni/g)} = n \times F$$

##### Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);  
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

#### A.9.2.6 Pernyataan hasil

##### A.9.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam



- cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

**Keterangan:**

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;  
 $n_1$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;  
 $n_2$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;  
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.
- Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
  - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan



- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.  
Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.
- g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan Petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah ( $<10$ ).

#### A.9.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
  - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.  
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

### A.9.3 Coliform

#### A.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

#### A.9.3.2 Peralatan

- a. Inkubator ( $35 \pm 1$ ) °C, terkalibrasi;
- b. Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ( $45,5 \pm 0,2$ ) °C;
- c. Rak untuk tabung reaksi;
- d. Pipet ukur 10 mL berskala 1 mL dan 1 mL berskala 0,1 mL steril;
- e. Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f. Tabung reaksi
- g. Tabung *Durham*;
- h. Cawan Petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- i. Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

#### A.9.3.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *Lauryl tryptose* (LT) broth;
- b) *Brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2%;
- c) *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);

#### A.9.3.4 Cara kerja

##### A.9.3.4.1 APM – Uji pendugaan untuk *coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet



- menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
  - amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- $(24 \pm 2)$ . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
  - tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
  - catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
  - lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

#### A.9.3.4.2 APM – Uji penegasan untuk *coliform*

- Pindahkan satu Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* yang berlainan,
- inkubasikan tabung-tabung BGLB *broth* tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif",
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- $(48 \pm 2)$ . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif", dan
- Hitunglah APM *coliform* dengan menggunakan Tabel A.1 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *coliform*

**Tabel A.1 – APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh**

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3,0	2	2	0	21
0	0	1	3,0	2	2	1	28
0	1	0	3,0	2	2	2	35
0	1	1	6,1	2	3	0	29
0	2	0	6,2	2	3	1	36
0	3	0	9,4	3	0	0	23
1	0	0	3,6	3	0	1	38
1	0	1	7,2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7,4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9,2	3	2	2	210



Tabel A.1 - (lanjutan)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

#### A.9.4 *Salmonella*

##### A.9.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pra pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media pengkayaan, dan kemudian dilanjutkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

##### A.9.4.2 Peralatan

- Inkubator ( $37 \pm 1$ ) °C;
- Otoklaf;
- Oven;
- Neraca, kapasitas 2000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- Penangas air, (44 sampai dengan 47) °C;
- Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ( $41,5 \pm 1$ ) °C;
- Penangas air bersuhu ( $37 \pm 1$ ) °C;
- pH meter;
- Blender dan blender jar (botol) steril;
- Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, *Erlenmeyer* 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- Jarum Ose (diameter  $\pm 3$  mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- Jarum Ose yang berujung runcing;
- Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 mm x 150 mm dan 20 mm x 150 mm; tabung serologikal, 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm;
- Botol pengencer 500 mL;
- Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- Vortex mixer*;
- Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- Fisher* atau *Bunsen burner*;
- Kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan



y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

#### A.9.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Buffered peptone water* (BPW);
- b) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RVS) (media RVS harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- c) *Muller – Kauffmann Tetrathionate / novobiocin* (MKTTn) *broth*;
- d) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar;
- e) *Hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *Bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *Triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) Urea agar;
- i) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- j) Larutan *physiological saline*, 0,85% (steril);
- k) Toluene;
- l) Kertas cakram  $\beta$ -galaktosidase;
- m) Media *Voges-Proskauer* (VP);
- n) Pereaksi uji *Voges-Proskauer* (VP);
- o) Larutan *creatine*;
- p) 1-*naphthol* yang dilarutkan dengan etanol;
- q) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40%;
- r) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- s) Pereaksi Kovacs;
- t) *Semi-solid Nutrient Agar* (NA);
- u) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- v) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent flagellar* (H) *antiserum*; dan
- w) *Salmonella anti-Vi* sera.

#### A.9.4.4 Cara Kerja

##### A.9.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL BPW steril. Kocok selama 2 menit;
- b) inkubasikan pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(18 \pm 2)$  jam.

##### A.9.4.4.2 Pengkayaan

- a) Pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media RVS dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL MKTTn *broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan
- b) inkubasikan media RVS pada suhu  $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam dalam penangas air bersirkulasi dan MKTTn *broth* pada  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam.

##### A.9.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan MKTTn *broth* ke dalam cawan Petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RVS;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama  $(24 \pm 3)$  jam pada suhu  $37 ^\circ\text{C}$ ;



- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi ( $24 \pm 3$ ) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi ( $24 \pm 3$ ) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
- XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.  
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
- HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.  
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
- BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.  
Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi ( $24 \pm 3$ ) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama ( $24 \pm 3$ ) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi ( $48 \pm 2$ ) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut.

#### A.9.4.4.4 Uji penegasan

##### A.9.4.4.4.1 Seleksi koloni untuk uji penegasan

- Ambil sedikitnya 1 koloni tipikal pada masing-masing cawan yang berisi media XLD, HE, dan BS, ambil kembali sedikitnya 4 koloni bila koloni pertama tidak tipikal;
- goreskan masing-masing koloni tersebut pada cawan yang berisi NA yang akan ditumbuhi oleh koloni yang terisolasi dengan baik, kemudian inkubasikan pada suhu ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam;
- gunakan kultur murni untuk uji penegasan biokimia dan serologi selanjutnya.

##### A.9.4.4.4.2 Uji penegasan biokimia

- Dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak;
  - inkubasi agar miring TSI pada suhu ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam. Pada TSI, perubahan yang terjadi pada medium adalah sebagai berikut:
 

- bagian tegak:	
kuning	glukosa positif
merah atau tak berubah warna	glukosa negatif
hitam	pembentukan H <sub>2</sub> S
gelembung atau retak	pembentukan gas dari glukosa
- permukaan agar miring:	
kuning	laktosa dan/atau sukrosa positif
merah atau tak berubah warna	laktosa dan sukrosa negatif
- 90% kasus tipikal *Salmonella* positif membentuk gelembung gas dan H<sub>2</sub>S (warna hitam);
- dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni pada A.9.4.4.4.1 dan inokulasikan ke dalam media Urea agar dengan cara menggores agar miring;
  - inkubasikan agar miring urea pada suhu ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam, dan amati setiap interval waktu tertentu. Pada Urea agar, reaksi positif ditunjukkan dengan reaksi pemecahan urea yang menghasilkan ammonia akan menunjukkan perubahan warna *phenol red* menjadi merah mawar hingga merah muda dan kemudian akan semakin pekat. Reaksi akan muncul setelah 2 jam sampai dengan 4 jam;



- e) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.9.4.4.4.1 ke dalam media LDB, kemudian inkubasikan pada  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam, reaksi positif pada LDB ditandai dengan terbentuknya kekeruhan dan warna ungu setelah inkubasi. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
- f) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.9.4.4.4.1 ke dalam tabung yang berisi 0,25 mL larutan *physiological saline* steril;
- g) tambahkan 1 tetes toluene dan kocok tabung. Tempatkan tabung pada penangas air bersuhu  $37 ^\circ\text{C}$  dan diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan sebanyak 1 lembar kertas cakram  $\beta$ -galaktosidase dan kocok hingga rata;
- h) inkubasikan tabung pada penangas air  $37 ^\circ\text{C}$  dan diamkan selama  $(24 \pm 3)$  jam, amati tabung pada interval waktu tertentu. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Reaksi muncul setelah 20 menit;
- i) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.9.4.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi 3 mL media VP, kemudian inkubasikan pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam;
- j) setelah inkubasi tambahkan dua tetes larutan *creatine*, tiga tetes larutan 1-*naphthol* yang dilarutkan dengan etanol, dan dua tetes larutan KOH 40%, kemudian kocok setelah penambahan tiap pereaksi tersebut. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah terang setelah 15 menit;
- k) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.9.4.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi media TB, kemudian inkubasikan pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam; dan
- l) setelah inkubasi tambahkan 1 mL pereaksi Kovacs. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin yang berwarna merah, sedangkan pembentukan cincin berwarna kuning menunjukkan reaksi negatif.

#### A.9.4.4.4.3 Interpretasi hasil uji biokimia

Interpretasi hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel A.2



Tabel A.2 – Interpretasi hasil uji biokimia

Uji biokimia	Galur <i>Salmonella</i>									
	<i>S. Typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>		<i>S. Paratyphi C</i>		Galur lain	
	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>
TSI asam dari glukosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI gas dari glukosa	- <sup>c</sup>	0	+	100	+		+		+	92
TSI asam dari laktosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI asam dari sukrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI produksi H <sub>2</sub> S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrolisis urea	-	0	-	0	-		-		-	1
<i>Lysine decarboxylation</i>	+	98	-	0	+		+		+	95
Reaksi $\beta$ -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>d</sup>
Reaksi Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Produksi indol	-	0	-	0	-		-		-	1
<b>CATATAN:</b> <sup>a</sup> Persentase mengindikasikan bahwa tidak semua serotipe <i>Salmonella</i> menunjukkan reaksi yang ditunjukkan dengan + atau -. Persentase dapat bervariasi antar serotipe dan dalam serotipe dari <i>food poisoning serotype</i> dari lokasi yang berbeda <sup>b</sup> Persentase tidak diketahui dari literatur <sup>c</sup> <i>Salmonella Typhi</i> bersifat anaerogenik <sup>d</sup> <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i> memberikan reaksi laktosa positif atau negatif namun selalu menunjukkan reaksi positif pada $\beta$ -galactosidase.										



**A.9.4.4.4.4 Uji penegasan serologi dan serotyping**

Deteksi keberadaan antigen O-, Vi-, dan H- *Salmonella* diuji dengan aglutinasi (penggumpalan) dengan sera yang sesuai, dari kultur murni yang diperoleh pada A.9.4.4.4.1 dan setelah galur auto-aglutinasi dihilangkan.

**A.9.4.4.4.4.1 Penghilangan galur auto-aglutinasi**

- Tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 % pada gelas objek yang bersih;
- suspensikan sebanyak 1 Ose penuh biakan dari A.9.5.4.4.1 sampai terbentuk suspensi yang homogen dan keruh;
- goyangkan gelas objek selama 30 sampai dengan 60 detik dan amati gelas objek, bila bakteri mengelompok menjadi unit-unit terpisah maka galur tersebut termasuk auto-aglutinasi, dan tidak dilanjutkan untuk pengujian tahap selanjutnya.

**A.9.4.4.4.4.2 Uji antigen O-**

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum O- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* O- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

**A.9.4.4.4.4.3 Uji antigen Vi-**

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 %;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum Vi- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* Vi- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.



#### A.9.4.4.4.4 Uji antigen H-

- Inokulasikan media NA semi solid dengan koloni murni yang bukan merupakan galur auto-aglutinasi;
- inkubasikan media pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam;
- dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- emulsikan biakan pada NA semi solid setelah inkubasi dengan 2 mL 0,85 % *saline* menggunakan jarum Ose;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan tersebut di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum H- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* H- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

#### A.9.4.4.4.5 Interpretasi hasil uji penegasan

Interpretasi hasil uji serologi yang merupakan uji penegasan dapat dilihat pada Tabel A.3.

**Tabel A.3 – Interpretasi hasil uji penegasan**

Reaksi biokimia	Auto-aglutinasi	Reaksi serologi	Interpretasi
Tipikal	Tidak	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Galur dipertimbangkan sebagai <i>Salmonella</i>
Tipikal	Tidak	Semua reaksi negatif	Kemungkinan adalah <i>Salmonella</i>
Tipikal	Ya	Tidak diuji	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Semua reaksi negatif	Bukan <i>Salmonella</i>

#### A.9.4.4.5 Pernyataan Hasil

Berdasarkan hasil interpretasi dapat menunjukkan keberadaan *Salmonella* pada contoh uji per 25 gram.

### A.9.5 *Listeria monocytogenes*

#### A.9.5.1 Prinsip

Pertumbuhan *Listeria* sp. pada pembenihan Oxford Agar berupa warna coklat kehitaman dengan disertai "halo" (zona) berwarna coklat sampai hitam di sekeliling koloni. Jika diperoleh koloni dengan ciri-ciri tersebut dilanjutkan dengan uji katalase, oksidase negatif dan motilitas, kemudian dilanjutkan dengan uji biokimia untuk menentukan *Listeria monocytogenes*. Identifikasi *Listeria monocytogenes* dilakukan menggunakan MICRO-ID *Listeria identification system*.



**A.9.5.2 Perbenihan, pengencer, pereaksi**a) *Listeria Enrichment Broth* (LEB);

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| - Tryptone soya broth  | 30,0 g |
| - Yeast extract powder | 6 g    |
| - Air suling           | 1 L    |
- pH 7,3

b) *Listeria Selective Enrichment Supplement*;

Setiap ampul berisi:

- |                             |                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| - Nalidixic acid            | 20,0 mg (setara dengan 40,0 mg/L) |
| - Cycloheximide             | 25,0 mg (setara dengan 50 mg/L)   |
| - Acriflavine hydrochloride | 7,5 mg (setara dengan 15 mg/L)    |

Masing-masing ampul cukup untuk 500 mL pembenihan. Sebelum digunakan larutkan bahan-bahan dalam ampul tersebut dengan 2 mL air suling steril.

Larutkan semua bahan-bahan dalam yang tercantum pada butir A.9.7.2.a dengan air suling, atur pH ( $7,3 \pm 0,2$ ), sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Sebelum pembenihan LEB ini digunakan, tambahkan *Listeria Selective Enrichment Supplement*.

c) *Oxford Agar* (pembenihan selektif dan diagnostik untuk mendeteksi *Listeria* sp.);

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| - Columbia agar base      | 39,0 g |
| - Aesculin                | 1,0 g  |
| - Ferric ammonium citrate | 0,5 g  |
| - Lithium chloride        | 15,0 g |
| - Air suling              | 1 L    |
- pH  $7,0 \pm 0,2$

d) *Listeria Selective Supplement* (Oxford Formulation);

Setiap ampul berisi:

- |                     |                                    |
|---------------------|------------------------------------|
| - Cycloheximide     | 200,00 mg (setara dengan 400 mg/L) |
| - Colistin sulphate | 10,00 mg (setara dengan 20 mg/L)   |
| - Acriflavine       | 2,5 mg (setara dengan 5 mg/L)      |
| - Cefotetan         | 1,0 mg (setara dengan 2 mg/L)      |
| - Fosfomicin        | 5,0 mg (setara dengan 10 mg/L)     |

Masing-masing ampul cukup untuk 500 mL pembenihan. Sebelum digunakan larutkan bahan-bahan dalam ampul tersebut dengan 5 mL alkohol/ air suling steril (1:1).

Siapkan Oxford Agar dengan cara sebagai berikut:

Suspensikan 27,75 g Oxford Agar (butir A.9.8.2.c) dengan 500 mL air suling, panaskan sampai semua bahan larut. Sterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Biarkan perbenihan dingin sampai suhu  $50^\circ\text{C}$ . Secara aseptik tambahkan *Listeria Selective Supplement* (Oxford Formulation). Sesudah semua suplemen tercampur, tuang pembenihan ke dalam cawan Petri.

e) *Trypticase Soy Agar- Yeast Extract* (TSA-YE);

- |                       |      |
|-----------------------|------|
| - Trypticase Soy Agar | 40 g |
| - Yeast Extract       | 6 g  |
| - Air suling          | 1 L  |
- pH  $7,3 \pm 0,2$

Larutkan semua bahan-bahan dalam air suling, atur pH ( $7,3 \pm 0,2$ ), sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Setelah selesai, kocok perbenihan ini untuk menyebarkan agar yang cair.



f) *Brain Heart Infusion (BHI) Broth*;

- <i>Calf braain infusion solids</i>	12,5 g
- <i>Beef heart infusion solids</i>	5,0 g
- <i>Protease peptone</i>	10,0 g
- Glukosa	2,0 g
- Natrium klorida (NaCl)	5,0 g
- <i>Disodium phosphate</i>	2,5 g
- Air suling	1 L

pH 7,3 ± 0,2

Siapkan perbenihan BHI *Broth* dengan cara sebagai berikut:

Suspensikan 47 g BHI *Broth* (butir A.9.7.2.f) dengan 1 L air suling, masukkan 10 mL perbenihan ke dalam tabung reaksi. Sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

g) Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3 %;h) N,N,N',N' – *Tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrichloride*;

- N,N,N',N' – <i>Tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrichloride</i>	1,0 g
- Air suling	100 mL

Larutkan pereaksi dengan air suling steril dingin. Siapkan pereaksi segera sebelum digunakan.

## i) Pereaksi untuk pewarnaan Gram;

## - Larutan A

Kristal violet (85 % sampai dengan 90 %) zat warna	2 g
Alkohol 95 %	20 mL

Larutan kristal violet dalam alkohol

## - Larutan amonium oksalat dalam air

Amonium oksalat	0,8 g
Air suling	80 mL

Larutan amonium oksalat dalam air suling

Campurkan kedua larutan A dan B tersebut dan simpan campuran selama 24 jam sebelum digunakan

- Larutan lugol (*Gram's iodine*)

Iodine (I <sub>2</sub> )	1 g
Kalium iodida (KI)	2 g
Air suling	300 mL

Campur Iodine (I<sub>2</sub>) dan Kalium Iodida (KI), tambahkan air suling sedikit demi sedikit sampai semua bahan larut.

- *Hucker's counterstain* (larutan safranin)

Larutan stok: Safranin O	2,5 g
Alkohol 95 %	100 mL

Larutan kerja: tambahkan 10 mL larutan stok ke dalam 90 mL air suling.

**A.9.5.3 Peralatan**

- Neraca analitik kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g
- Autoklaf, 121 °C ± 1 °C;
- Oven, 173 °C ± 3 °C terkalibrasi;
- Inkubator, 25 °C ± 1 °C, 30 °C ± 1 °C, dan 37 °C ± 1 °C terkalibrasi
- Mikroskop;
- Gelas objek beserta penutupnya;
- Botol pengencer;
- Tabung reaksi;
- Cawan petri
- Pipet volumetrik 5 mL, 1 mL terkalibrasi; dan
- Jarum ose.



**A.9.5.4 Cara kerja****A.9.5.4.1 Homogenisasi contoh dan pengkayaan**

- Timbang 25 g contoh secara aseptis lalu masukkan ke dalam perbenihan LEB yang ditambahkan dengan *Listeria Selective Enrichment Supplement*. Tujuannya adalah untuk memperbaiki kembali sel-sel bakteri yang rusak atau viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan;
- inkubasi beberapa waktu dalam perbenihan LEB tersebut pada suhu 30 °C, kemudian tambahkan *Listeria Selective Enrichment Supplement*;
- inkubasi dilanjutkan kembali pada suhu 30 °C sampai mencapai waktu 48 jam.

**A.9.5.4.2 Isolasi**

- Setelah inkubasi 48 jam, goreskan biakan dari LEB ke perbenihan selektif Oxford Agar;
- inkubasi cawan-cawan tersebut dengan posisi terbalik pada suhu 37 °C selama 48 jam;
- periksa koloni yang tumbuh pada Oxford agar, koloni tipikal *Listeria* sp. berwarna coklat kehitaman dan dikelilingi *halo* (zona) yang berwarna coklat sampai hitam di sekeliling koloni;
- goreskan masing-masing koloni yang terpilih pada agar miring TSA-YE dalam tabung reaksi, inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam atau sampai tumbuh koloni;

**A.9.5.4.3 Identifikasi****A.9.5.4.3.1 Uji katalase**

- Dengan menggunakan pipet tetes, teteskan 1 tetes hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% ke permukaan gelas obyek;
- ambil koloni-koloni tersangka dari agar miring TSA-YE;
- dengan hati-hati suspensikan masing-masing koloni ke dalam hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% tersebut;
- periksa ada atau tidaknya pembentukan gelembung udara, jika katalase positif segera muncul gelembung-gelembung udara.

**A.9.5.4.3.2 Uji oksidase**

- Ambil koloni-koloni tersangka dari agar miring TSA-YE ;
- sentuhkan di atas kertas saring yang telah dibasahi dengan larutan N,N,N',N'-*Tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrichloride*;
- uji oksidase positif jika warna kertas saring berubah jadi ungu, dan uji negatif jika warna kertas saring tidak berubah dalam waktu 10 detik.

**A.9.5.4.3.3 Uji motilitas**

- Inokulasikan 1 ose koloni tersangka yang terdapat pada agar miring TSA-YE ke dalam perbenihan BHI *Broth* dan inkubasi pada suhu ruang, hal ini dikarenakan *Listeria* sp. tidak membentuk flagela pada suhu di atas 30 °C sampai dengan 33 °C;
- teteskan suspensi pada gelas obyek, tutup dengan *cover slip* diikuti dengan minyak imersi; dan
- amati motilitas suspensi bakteri setelah diinkubasi 4 sampai dengan 5 jam dengan menggunakan mikroskop;
- Listeria* sp. mempunyai ciri gerakan yang khas yaitu berguling dan berputar. Jika pada waktu inkubasi tersebut motilitas tidak kelihatan di bawah mikroskop, amati kembali pada waktu inkubasi 18 jam sebelum pengamatan dinyatakan negatif (non motil).



**A.9.5.4.3.4 Pewarnaan Gram**

- a) Buat suspensi sel bakteri di atas gelas obyek, keringkan di udara dan fiksasikan dengan panas;
- b) warnai suspensi dengan larutan kristal violet – amonium oksalat selama 1 menit, cuci dengan air dan tiriskan;
- c) bubuhkan larutan lugol selama 1 menit, cuci dengan air dan tiriskan;
- d) cuci (hilangkan warna) dengan alkohol 95% selama 30 detik, cuci dengan air, tiriskan;
- e) bubuhkan Hucker's counterstain (larutan safranin) selama 10 sampai dengan 30 detik, cuci dengan air kran, tiriskan, serap dengan kertas saring, keringkan, dan periksa di bawah mikroskop. Sel *Listeria* spp. berbentuk batang Gram positif, biasanya berpasangan dengan bentuk V. Pasangan sel-sel tersebut berdekatan satu dengan lainnya.

**A.9.5.4.3.5 Interpretasi hasil uji**

- a) Seluruh spesies *Listeria* spp. membentuk koloni berwarna coklat kehitaman pada perbenihan Oxford Agar dengan disertai *halo* (zona) berwarna coklat sampai hitam di sekeliling koloni, uji katalase positif, uji oksidase negatif, motil berguling dan berputar, serta sel bakteri berbentuk batang berpasangan dengan bentuk V Gram positif;
- b) identifikasi *Listeria monocytogenes* dilakukan dengan MICRO-ID *Listeria Identification System*, interpretasi hasil uji MICRO-ID dapat dilihat pada tabel A.4;





Tabel A.4 – Interpretasi hasil uji MICRO-ID *Listeria Identification System*

Uji	Singkatan	Reaksi positif	Reaksi negatif
Voges-Proskauer	VP	Merah muda hingga merah	Kuning terang
Nitrat reduktase	N	Merah	Tidak berwarna hingga merah muda terang
Fenilalanin deaminase	PD	Hijau	Kuning terang
Hidrogen sulfida	H <sub>2</sub> S	Coklat terang	Putih
Indol	I	Merah muda hingga merah	Kuning terang hingga jingga
Ornithin dekarboksilase	OD	Ungu hingga ungu kemerahan	Amber hingga kuning
Lysine dekarboksilase	LD	Ungu hingga ungu kemerahan	Amber hingga kuning
Utilisasi malonate	M	Hijau hingga biru	Kuning
Urease	U	Jingga hingga merah-ungu	Kuning
Hidrolisis esculin	E	Coklat hingga hitam	Tidak berwarna atau beige
β-galaktosidase	ONPG	Kuning terang hingga kuning	Tidak berwarna
Fermentasi xylose	Xyl	Kuning hingga <i>amber</i>	Merah-ungu hingga ungu
Fermentasi rhamnose	Rham	Kuning hingga <i>amber</i>	Merah-ungu hingga ungu
Fermentasi mannitol	Mann	Kuning hingga <i>amber</i>	Merah-ungu hingga ungu
Fermentasi sorbitol	Sorb	Kuning hingga <i>amber</i>	Merah-ungu hingga ungu

- c) setelah melakukan interpretasi hasil, laporkan keberadaan atau ketidakhadiran *L. monocytogenes* pada contoh uji dengan menyebutkan kuantitas dari contoh uji yang digunakan (gram)



## Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 920.153, Ash of Meat*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 39.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 950.46, Moisture in Meat, Air Drying*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 39.1.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 974.14, Mercury in Fish, Alternative Digestion Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.24.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 981.10, Crude Protein in Meat*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 39.1.19.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 991.36, Fat (Crude) in Meat and Meat Products*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 39.1.08.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 992.18, Listeria species, Biochemical Identification Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 17.10.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 993.12, Listeria monocytogenes in Milk and Dairy Products*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 17.10.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- International Standard Organization. 2002. *ISO 6579: 2002, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp.* 4<sup>th</sup> Edition.
- International Standard Organization. 2003. *ISO 4833: 2003, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms – Colony-count Technique at 30 °C.* 3<sup>rd</sup> Edition.
- SNI 7387: 2009. Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan
- SNI 7388 : 2009. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.